

Maßanalytische Bestimmung des Hämoglobins.

Von

St. Rusznyák und E. B. Hatz.

(Aus dem Chemischen Laboratorium der Medizinischen Klinik der Kgl.
Ungar. Franz Josef-Universität in Szeged.)

(Eingegangen am 19. Juli 1935.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Die meist üblichen Hämoglobinbestimmungen wurzeln in dem Prinzip, daß das Hämoglobin in irgendein farbiges Derivat überführt wird, dessen Menge durch Vergleich mit einer Standardlösung von bekannter Konzentration ermittelt wird. Die Genauigkeit der durch diese kolorimetrischen Methoden erreichten Resultate ist zwar vom medizinisch-praktischen Standpunkt ganz befriedigend, sie entspricht jedoch kaum den Anforderungen, die bei experimentellen Untersuchungen gestellt werden müssen. Auch wurden Methoden ausgearbeitet, die die Bestimmung des Bluthämoglobins auf die Bestimmung des Eisengehalts des Blutes zurückführen. Aus neueren Untersuchungen ging jedoch hervor, daß ein Teil des im Blute befindlichen Eisens nicht an Hämoglobin gebunden ist.

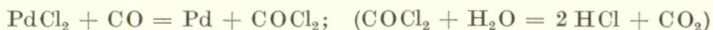
Eine vollkommen zuverlässige, jedoch wenig gebräuchliche Bestimmungsmethode beruht auf der Eigenschaft des Hämoglobins, daß es sich mit gewissen Gasen zu Komplexen verbindet. Setzt man aus so einer Komplexverbindung das Gas wiederum in Freiheit, so kann man durch eine Gasvolumbestimmung zu Zahlenwerten gelangen, aus denen man die Menge des Hämoglobins leicht berechnen kann. Von den Gasen, die das Hämoglobin zu binden fähig ist (Kohlenoxyd, Sauerstoff, Cyanwasserstoff), kommt bei der gasometrischen Hämoglobinbestimmung in erster Reihe das Kohlenoxyd in Betracht, und zwar hauptsächlich deshalb, weil es in Wasser — so auch im Plasma — kaum löslich ist und weil es vom Hämoglobin sehr energisch gebunden wird. Obzwar die mit Hilfe von Kohlenoxyd durchgeführten gasometrischen Bestimmungen zweifelsohne sehr genaue Resultate liefern, konnten sich diese Methoden im Laboratoriumsbetrieb doch nicht genügend einbürgern. Das Hindernis ihrer allgemeineren Verbreitung ist wohl in dem Umstand zu suchen, daß sie verhältnismäßig recht komplizierte und teure Apparate beanspruchen und ihre Durchführung sehr große Übung und peinlichste Sorgfalt erfordert.

Die sehr genauen Resultate, die die CO-gasometrische Methode¹ liefert, veranlaßten uns, dieses Verfahren zu einer maßanalytischen

¹ Siehe *van Slyke u. Hiller, J. of biol. Chem.* 78, 807, 1928.

Bestimmungsmethode des Hämoglobins auszuarbeiten. Dies schien uns dadurch möglich, daß *L. W. Winkler*¹ unlängst eine maßanalytische Methode bekannt gab, die sich zur genauen Bestimmung äußerst geringer CO-Mengen eignet. Durch Einbeziehung der letztgenannten Methode konnten wir in der Tat unser gesetztes Ziel ohne nennenswerte Schwierigkeit erreichen.

Das *Prinzip unserer Methode* ist folgendes: Eine bestimmte Menge des defibrinierten Blutes wird mit Kohlenoxyd gesättigt und das überschüssige, also durch Hämoglobin nicht gebundene Kohlenoxyd mit Stickstoff aus dem Absorptionsgefäß verdrängt. Nun wird das gebundene Kohlenoxyd mittels Kaliumferrieyanid in Freiheit gesetzt und mit Stickstoff quantitativ in ein Sammelgefäß getrieben. Das Gasmisch (CO und N₂) wird im geschlossenen Gefäß mit einer kaliumbromidhaltigen Palladochloridlösung in Reaktion gebracht, wobei nach der Gleichung



eine mit dem Kohlenoxyd äquivalente Menge metallisches Palladium zur Ausscheidung gelangt. Der fein verteilte Metallniederschlag wird mit einer bestimmten Menge Kaliumbromatlösung bekannten Titors versetzt und das Reaktionsgemisch angesäuert. Durch Wechselwirkung der aus dem Kaliumbromat in Freiheit gesetzten Bromsäure und der aus dem Kaliumbromid in Freiheit gesetzten Bromwasserstoffsäure entsteht eine dem Kaliumbromat äquivalente Menge Brom, die nun auf das Palladium unter Bildung von Palladbromid lösend einwirkt. Der Überschuß des Broms wird mit Hilfe des von *L. W. Winkler*² ausgearbeiteten bromometrischen Verfahrens maßanalytisch ermittelt.

Erforderliche Geräte.

a) Rundkolben von 100 bis 150 ccm Inhalt, zur CO-Entwicklung.

b) 2 Waschflaschen³, die zugleich die Rolle des Druckreglers übernehmen (Abb. 1). Rohr „a“ der einen Flasche wird mit dem CO-Entwickler verbunden, das analoge Rohr der zweiten Flasche mit einem Stickstoff-

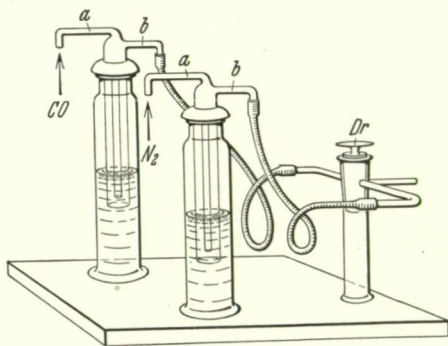


Abb. 1.

¹ Zeitschr. f. anal. Chem. 97, 18, 1934. — ² Zeitschr. f. angew. Chem. 28, I, 480, 1915. — ³ Siehe auch *Fr. Pregl*, Die quantitative organische Mikroanalyse.

gasometer. Die Röhre „b“ werden an einen T-Hahn (Dr) angeschlossen, dessen dritte Verzweigung an das Sättigungsgefäß (s. unten) angekuppelt wird.

c) Sättigungsgefäß laut Abb. 2.

d) Sammelgefäß laut Abb. 3.

Die Bereitung des Kohlenoxyds. Ein mit 5 ccm konz. Schwefelsäure beschickter Rundkolben (langhalsiger) von 100 bis 150 ccm Inhalt wird mit einem dicht sitzenden, zweifach durchbohrten Gummistopfen verschlossen.

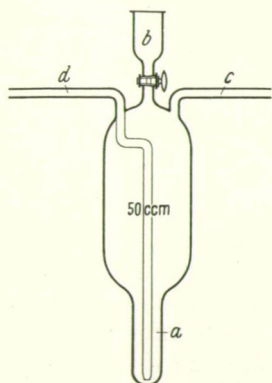


Abb. 2.

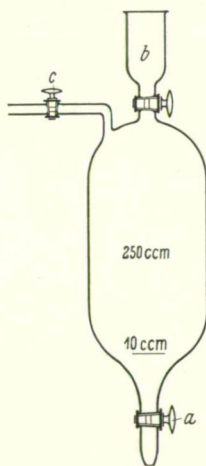


Abb. 3.

Durch die eine Bohrung des Stopfens führt das Rohr eines Tropftrichters, die zweite Bohrung durchläuft ein rechtwinklig gebogenes Rohr, dessen freies Ende mittels eines Schlauchstückes an die eine Waschflasche angeschlossen wird. Aus dem Tropftrichter läßt man auf einmal 0,5 bis 1 ccm Ameisensäure zur Schwefelsäure einfließen und erwärmt den Kolben mit kleiner Flamme durch ein Drahtnetz so lange, bis eine lebhaft Gasentwicklung einsetzt. Sollte die Gasentwicklung vorzeitig abflauen, führt man tropfenweise weitere Mengen Ameisensäure ein.

Erforderliche Reagenzien.

1. Octylalkohol.
2. Kaliumferricyanidlösung: 92 ccm 32%ige Kaliumferricyanidlösung + 8 ccm konz. Milchsäure (D 1,2).

3. Palladochloridlösung, die nach folgender Vorschrift *L. W. Winklers* bereitet wird: „Man löst 0,2 g reines metallisches Palladium (Blech oder Draht) unter gelindem Erwärmen in etwa 10 ccm Königswasser. Die Lösung wird in einer 50 ccm fassenden Porzellanschale auf dem Dampfbad eingetrocknet. Den Rückstand löst man in 10 ccm 20%iger Salzsäure und trocknet wieder ein; das Eintrocknen mit Salzsäure ist noch dreimal zu wiederholen. Der endgültige, nitratfreie Rückstand wird mit 10 g Kaliumbromid zusammen unter Erwärmen in 20 ccm n Salzsäure und 100 ccm Wasser gelöst. Die Lösung wird mit einigen Körnchen Bimsstein und 1 ccm stärkstem Weingeist versetzt, in einem *Erlenmeyer*-Kolben etwa 10 Minuten lang im Sieden gehalten, um das beim Eintrocknen allenfalls nicht zersetzte Palladichlorid zu Palladochlorid zu reduzieren, weiterhin, um den Überschuß des Weingeistes zu vertreiben. Nach dem Erkalten werden in der Flüssigkeit 5 g reines kristallisches Natriumacetat ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$) gelöst. Die durch einen kleinen Wattebausch filtrierte Lösung wird mit dem Washwasser auf 200 ccm verdünnt. Die 1 % Palladium enthaltende rötlich-braune, kristallklare Flüssigkeit hält sich in einer Glasstöpselflasche unverändert.“

4. 0,02 n Kaliumbromatlösung: 0,5567 g pro anal. Kaliumbromat werden in dest. Wasser zu 1 Liter gelöst.

5. 0,02 n Arsenitlösung, die nach folgender Vorschrift *L. W. Winklers*¹ bereitet wird: „In einem *Erlenmeyer*-Kölbchen werden 0,9893 g allerreinstes, bei 100° getrocknetes Arsenitrioxyd (zur Analyse) mit 1 g Natriumhydroxyd und etwa 20 ccm Wasser auf dem Dampfbad erwärmt, bis sich das Arsenitrioxyd gelöst hat. Die Lösung kommt in den Literkolben und wird hier mit dem Spülwasser auf etwa 500 ccm verdünnt. Zuletzt werden in den Kolben 2 ccm konz. Schwefelsäure gegeben. Nachdem die Lösung den Wärmegrad des Arbeitsraumes angenommen hat, wird auf 1000 ccm verdünnt.“

6. Jodlösung: 0,053 g gepulvertes Jod werden in 1 ccm n Natronlauge gelöst und die Lösung mit dest. Wasser auf 1000 ccm verdünnt.

7. Tetrachlormethan. Es darf nur ein reinstes Präparat angewendet werden.

8. 10 %ige Salzsäure.

Gang der Bestimmung.

1 bis 2 ccm des Blutes werden durch den Trichter „b“ in das Sättigungsgefäß (Abb. 2) eingeführt, der Benetzungsrückstand mit 3 bis 4 ccm destilliertem Wasser hineingewaschen und schließlich — zur Vermeidung des Schäumens — 2 Tropfen Octylalkohol zugesetzt. Rohr „d“ des Gefäßes wird mit der Waschvorrichtung verbunden, der *T*-Hahn in die Richtung des CO-Entwicklers gestellt und die CO-Entwicklung in Gang gesetzt. Man läßt ungefähr 1 Minute lang einen lebhaften CO-Strom durch das Blut streichen; dies genügt vollständig zur Sättigung des Blutes. Nun wird der *T*-Hahn in die Richtung des Stickstoffgasometers umgestellt und 5 Minuten lang ein lebhafter Stickstoffstrom durch das System geleitet. Nach Ablauf der fünften Minute wird der Gasstrom abgestellt und das Rohr „c“ des Sättigungsgefäßes mittels eines Stückchen Vakuumschlauches mit dem Rohr „c“ des Sammelgefäßes (Abb. 3) verbunden. Letzteres wird vor dem Ankuppeln vollständig mit destilliertem Wasser gefüllt. Sind die zwei Gefäße miteinander verbunden, öffnet man die Hähne „c“ und „a“ des Sammelgefäßes und läßt in das Sättigungsgefäß durch dessen Trichter „b“ 10 ccm destilliertes Wasser und darauffolgend 0,5 ccm Kaliumferricyanidlösung einfließen; ein Lufteintritt muß selbstredend sorgfältigst vermieden werden. Nun läßt man durch Rohr „d“ in langsamen Strom Stickstoff streichen, um das durch das Kaliumferricyanid in Freiheit gesetzte Kohlenoxyd aus dem Sättigungsgefäß in das Sammelgefäß zu überführen. Das einströmende Gas verdrängt aus dem Sammelgefäß allmählich das Wasser; man stelle den Gasstrom so ein, daß das Austropfen des Wassers ungefähr 4 bis 5 Minuten in Anspruch nimmt. Man läßt übrigens das Wasser nicht gänzlich ausfließen, sondern nur soweit, daß noch ungefähr 10 ccm im Gefäß zurückbleiben. Ist dieser Zustand

¹ Zeitschr. f. anal. Chem. 97, 18, 1934.

erreicht, so werden die Hähne bei „a“ und „c“ gleichzeitig geschlossen und das Gefäß abgekuppelt.

Durch den Hahn bei „a“ saugt man mit Hilfe eines Schlauches die noch zurückgebliebene Wassermenge heraus (Hahn bei „b“ und „c“ bleibe unterdessen geschlossen!), und achtet sorgfältig darauf, daß kein Gasverlust entstehe. Durch diese Operation entsteht im Gefäß ein schwaches Vakuum, so daß jetzt die Einführung von 10 ccm Palladochloridlösung durch den Trichter „b“ ohne Schwierigkeit und Gasverlust erfolgen kann. Man schüttelt das von der Außenluft verschlossene Gefäß einigemal und läßt es 2 Stunden stehen. Während des Stehens wird das Schütteln noch einigemal wiederholt, damit die Gefäßwand mit frischer Reagenslösung benetzt wird. Nach Ablauf der 2 Stunden ist die Reaktion beendet und es kann mit der Bestimmung des ausgeschiedenen Palladiums begonnen werden. Zu diesem Zweck führt man durch den Trichter „b“ der Reihe nach 2 ccm Tetrachlormethan, 2,00 ccm 0,02 n-Kaliumbromatlösung, 5 ccm 10 %ige Salzsäure und 1 ccm Jodlösung in das Gefäß ein. Man schüttelt das Reaktionsgemisch so lange, bis sich der Palladiumniederschlag vollständig gelöst hat. Jetzt wird die Flüssigkeit durch den Hahn bei „a“ in einen Meßzylinder mit eingeschliffenem Stopfen von 25 ccm Inhalt abgelassen und das Sammelgefäß zweimal mit je 2 bis 3 ccm destilliertem Wasser nachgespült.

Die Ermittlung des Bromüberschusses erfolgt nun auf folgende Weise: Das Reaktionsgemisch wird tropfenweise so lange mit der Arsenitlösung versetzt, bis sich nach starkem Aufschütteln das am Boden des Zylinders angesammelte Tetrachlormethan eben schwach rosa angefärbt hat. Dieser Endpunkt der Titration kann sehr scharf erfaßt werden, da die anfänglich gelbe Farbe des Tetrachlormethans mit der stufenweisen Abnahme des Bromgehalts immer mehr verblaßt und später ganz verschwindet. Erst nach dieser vollkommenen Entfärbung tritt dann — durch weiteren Zusatz der Meßlösung — plötzlich die Rosafärbung auf.

Die Titerstellung der Lösungen erfolgt durch einen Blindversuch, den man auf folgende Weise ausführt: Man beschickt den Meßzylinder mit 10 ccm Palladochloridlösung, 5 ccm 10 %ige Salzsäure, 2 ccm Tetrachlormethan, 2,00 ccm 0,02 n Kaliumbromatlösung und 1 ccm Jodlösung und läßt in das Gemisch aus der Meßbürette vorerst 1,8 ccm 0,02 n Arsenitlösung träufeln. Man schüttelt stark und versetzt tropfenweise mit der Arsenitlösung und schüttelt nach jedem hinzugefügten Tropfen stark um. Der Äquivalenzpunkt kann auf diese Weise sehr genau beobachtet werden. Bis zur Rosafärbung des Tetrachlormethans werden gewöhnlich $1,90 \pm 0,05$ ccm Arsenitlösung verbraucht.

Die Berechnung beruht auf folgenden Zusammenhängen: 1 ccm 0,02 n Kaliumbromatlösung = 0,224 ccm CO (0° C, 760 mm); 1,34 ccm

CO (0° C, 760 mm) = 1 g Hämoglobin. Der Hämoglobingehalt läßt sich demnach mit Hilfe folgender Formel berechnen: Hämoglobin in 100 ccm

$$\text{Blut} = \frac{(a - b) \cdot 22,4}{1,34}, \text{ wenn zur Bestimmung 1 ccm Blut herangezogen}$$

wurde. Hier bedeuten: „a“ die verbrauchte Kubikzentimeterzahl der Arsenitlösung beim Blindversuch, „b“ die verbrauchte Kubikzentimeterzahl an Arsenitlösung bei der eigentlichen Bestimmung.

In der Tabelle I haben wir einige Resultate angeführt, die die Zuverlässigkeit und Genauigkeit unserer Methode beweisen. In Tabelle II haben wir die Resultate unserer Methode mit den Resultaten der gasometrischen Methode von *van Slyke* und *Hiller*¹ verglichen. Wie ersichtlich, stimmen die Resultate miteinander sehr gut überein.

Tabelle I.

		Hämoglobin in ‰
L. J.	2 ccm Blut	17,4
	1 „ „	17,7
M. P.	2 „ „	10,01
	1 „ „	10,0
D. M.	2 „ „	12,5
	1 „ „	12,7

Tabelle II.

	Hämoglobin in ‰	
	nach <i>van Slyke</i>	maßanalytisch
J. I.	12,20	12,28
I. J.	11,43	11,36

Zusammenfassung.

Zur Hämoglobinbestimmung wird eine Methode empfohlen, welche auf einer titrimetrischen Bestimmung der Kohlenoxydkapazität des Blutes beruht.

¹ J. of. biol. Chem. 78, 807, 1928.